 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.11.05 J South Med Univ, 2015, 35(11): 1540-1545

基础研究

HMGB1对人鼻咽癌细胞株C666-1体外增殖的影响

华胜妮[1],肖芦山[2],吴德华[1]
南方医科大学南方医院[1]放疗科,[2]感染内科,广东 广州 510515

摘要:目的 观察高迁移率族蛋白1(HMGB1)对人鼻咽癌细胞株C666-1增殖的影响并探讨其可能的机制。**方法** 用siRNA干扰鼻咽癌细胞株C666-1 HMGB1基因,CCK-8检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期,Western blot检测cyclin D1,CDK6及相关通路蛋白表达。用带GFP的HMGB1质粒转染鼻咽癌细胞株C666-1,EDU和CCK-8检测细胞增殖。**结果** 干扰HMGB1的表达后,细胞增殖明显减慢(P<0.001);细胞周期分析显示处于G1期细胞比例增多(P<0.001),S期细胞比例明显下降(P<0.001);Western blot结果显示cyclin D1、CDK6的表达下调,STAT3,P-STAT3的表达也下调。过表达HMGB1后,EDU显示处于S期细胞比例增多(P<0.05);CCK-8显示细胞增殖明显增快(P<0.001)。**结论** HMGB1促进人鼻咽癌细胞株C666-1的增殖,可能通过STAT3信号通路上调cyclin D1、CDK6促进鼻咽癌细胞株C666-1由G1期进入S期从而调控其增殖。
关键词:HMGB1;鼻咽癌;增殖

Effect of HMGB1 on proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 *in vitro*

HUA Shengni[1], XIAO Lushan[2], WU Dehua[1]
[1]Department of Radiation Oncology, [2]Department of Infectious Disease, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effect of high-mobility group box-1 protein (HMGB1) on the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 and explore the possible underlying mechanisms. **Methods** Cultured C666-1 cells were treated with a siRNA targeting HMGB1 gene. The changes in the cell proliferation were detected by CCK8 analysis, the cell cycle distribution was assayed with flow cytometry, and the expressions of cyclin D1, CDK6 and related pathway proteins were detected with Western blotting. The effect of a HMGB1 plasmid carrying the reporter gene GFP on the proliferation of C666-1 cells was tested with CCK8 and EDU analysis. **Results** Compared with the control cells, the cells transfected with the siRNA targeting HMGB1 showed obviously suppressed cell proliferation (P<0.001), cell cycle arrest in G1 phase (P<0.001), and down-regulated expressions of cyclin D1, CDK6, STAT3 and P-STAT3. Overexpression of HMGB1 in cells transfected with the HMGB1 plasmid showed a significantly increased ratio of S phase cells (P<0.05) and obviously enhanced cell proliferation (P<0.001). **Conclusion** HMGB1 can promote the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 by up-regulating cyclin D1 and CDK6 via the STAT3 signaling pathway.
Key words: HMGB1; nasopharyngeal carcinoma; proliferation

高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)是一类真核细胞细胞核内含量丰富的非组蛋白染色体结合蛋白。HMGB1参与核小体结构的构建和稳定,调节基因的转录,参与细胞的增殖[1],分泌于细胞外的HMGB1能够与细胞表面晚期糖基化终末产物受体(RAGE)结合,在调节细胞分化,增殖,炎症,迁移和生存等细胞生命活动中起重要作用[2]。有报道在多种肿瘤组织中有HMGB1的高表达,提示HMGB1可能参与肿瘤的发生发展[3-5]。

鼻咽癌的治疗以放射治疗为主[6],其治疗失败的主要原因为局部复发和远处转移[7]。我们课题组前期针对HMGB1在鼻咽癌中的表达进行了研究[8],但是其在鼻咽癌细胞株C666-1中的作用尚未见文献报导。本文拟观察HMGB1对人鼻咽癌细胞株C666-1增殖的影响并探讨其可能的机制。

1 资料和方法

1.1 材料

C666-1人鼻咽癌细胞株来源于南方医科大学肿瘤研究所,胎牛血清购自BD公司;PRMI 1640培养基、PBS、OPTI-MEN购自GIBCO公司;胰蛋白酶消化液购自吉诺公司;瞬时转染试剂Lipofectamine RNAiMAX

收稿日期:2015-03-11
基金项目:国家自然科学基金(81172056,81172586,81401180,81372283)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81172056, 81172586, 81401180, 81372283).
作者简介:华胜妮,博士研究生,E-mail: huashengni0401@163.com;肖芦山,硕士研究生, E-mail: 13755111870@163.com。华胜妮、肖芦山共同为第一作者
通信作者:吴德华,教授,博士生导师,主任医师,E-mail: 18602062748@163.com

购自Life Technologies公司;RIPA蛋白裂解液购自罗氏公司;Western blot电泳系统为Bio-Rad公司产品;PVDF膜购自Bio-Rad公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白Marker购自Thermo Fisher Scientific公司;脱脂奶粉购自广州威佳科技有限公司;牛血清白蛋白购自广州斯佳科技有限公司;Cyclin D1单克隆鼠抗体购自Santa Cruz公司,β-actin兔单克隆抗体购自Bioword公司;羊抗兔、抗鼠二抗购自Abcam公司;发光液购自Bio-Rad公司;显影液、定影液购自天津市世纪奥博商贸有限公司;发光胶片购自Carestream公司;细胞周期检测试剂盒购自碧云天公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖-毒性检测试剂盒购自DOJINDO公司;EDU检测试剂盒购自吉凯公司;siHMGB1,siNC由上海吉玛公司合成;siHMGB1 RNA Oligo:正义链5'-3'CCCGUUAUGAAAGAGAAAUTT和反义链5'- 3'A UUUCUCUUUCAUAACGGGTT; siNC RNA Oligo:正义链5'-3'UUCUCCGAACGUGUCACGUTT和反义链5'-3'ACGUGACACGUUCGGAGAATT。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞株C666-1采用含10%胎牛血清的PRMI 1640培养基培养,置于37 ℃,5% CO_2培养箱内培养,并于倒置显微镜下观察细胞生长状态,每1~2 d适时更换培养基,细胞长到80%左右用胰酶消化传代。取生长状态良好的细胞用于实验。

1.2.2 siRNA瞬时转染 取生长状态良好的细胞,前1 d晚上铺6孔板,每个6孔板细胞密度约为30%~40%,确保细胞均匀铺于板底。第2天早上待细胞贴壁后不久即进行siRNA转染,每孔先将5 μLsiRNA和5 μL iMAX分别稀释于250 μL Opti-MEN中,置于冰盒孵育5 min,然后将二者混匀,静置20 min,加至残留有1.5 mL培养基的6孔板中。放入培养箱中培养用于后续的实验。

1.2.3 质粒瞬时转染 取生长状态良好的细胞,前1 d晚上铺6孔板,每个6孔板细胞密度约为70%~80%,确保细胞均匀铺于板底。第2天早上待细胞贴壁后不久即进行质粒转染,将5 μg质粒和10 μL P3000稀释于125 μL Opti-MEN中,另将3.75 μL lipo-3000也稀释于125 μL Opti-MEN中,然后将二者混匀,室温静置5 min,加至残留有2.25 mL培养基的6孔板中。放入培养箱中培养,5 h后换液,用于后续的实验。

1.2.4 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试验 取瞬时转染12 h之后的细胞铺96孔板,细胞重悬成单细胞悬液,每孔1×10^3个细胞,100 μL培基,每组3个复孔,由于孔板周边孔液体容易蒸发,故96孔板边上一圈的孔不铺细胞,只加PBS或者培基,培基用于调零。细胞置于37 ℃,5% CO_2培养箱内培养。12 h之后第1次检测,每孔加入10 μL的CCK-8溶液(注意不要在孔中生成气泡,它们会影响A值的读数)。将培养板在培养箱内孵育2 h后用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。24 h之后第2次检测,以后每隔1 d的同时间点进行检测。

1.2.5 细胞周期检测 细胞瞬时转染之后72 h,待细胞长至80%~90%面积,弃培养基,PBS洗2遍,胰酶消化,收集细胞沉淀,PBS洗2遍,弃PBS,用预冷的75%酒精固定细胞(把细胞缓慢加入酒精中,一边加,一边摇匀,防止产生絮状物),放入−20 ℃保存,至少固定8 h以上。上机前准备:取固定好的细胞,离心弃上清,PBS洗2遍,加入300~400 μL PBS重悬,吹散成单细胞悬液,加入5 μL的RNase,放置15 min之后加入5 μL浓度为10 pmol/L的PI。避光染色5 min后,流式细胞仪上机检测。重复3次。

1.2.6 EDU 取瞬时转染24 h之后的细胞铺96孔板,细胞重悬成单细胞悬液,每孔5×10^3个细胞,100 μL培基,每组3个复孔,细胞置于37 ℃,5% CO_2培养箱内培养。12 h之后EDU检测。细胞加入1000∶1稀释的EDU溶液培养2 h,弃培基,PBS洗2遍,每遍5 min,每孔加50 μL固定液室温孵育30 min,弃固定液后每孔加50 μL 2 mg/mL甘氨酸,弃甘氨酸溶液,PBS清洗1遍,每孔100 μL渗透剂脱色摇床孵育10 min,PBS洗1遍。每孔加50 μL APOLLO染色液,避光室温脱色摇床孵育30 min,再加入100 μL渗透剂,脱色摇床清洗2~3遍,每遍10 min,弃渗透剂,每孔100 μL甲醇清洗1~2次,PBS清洗1次,最后核染拍照。

1.2.7 Western blot 取瞬时转染48 h之后的细胞,弃培养基,PBS洗3遍后吸干,加入配置好的RIPA细胞裂解液充分裂解(1×RIPA∶100×CK∶100×磷酸酶抑制剂=100∶1∶1)。将裂解液吸入标记好的EP管中,漩涡振荡器上每隔10 min震荡1次,每次15 s,共3次。12 000 g,4 ℃离心30 min,将上清转移至一新的EP管中(注意不要吸到沉淀物)。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度:取一块96孔板,根据样品的数量,按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B(200∶4),配制适量BCA工作液,摇床上充分混匀;各孔加入200 μL的BCA工作液,18 μL ddH_2O,2 μL蛋白样品(标准品按照说明书加样);37 ℃放置30 min后,在562 nm波长下比色测定,以蛋白含量(μg)为纵坐标,吸光值(A)为横坐标,绘出标准曲线。根据所测样品的吸光值,在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量(μg),除以样品总体积(2 μL),即为样品实际浓度(单位μg/μL)。按照蛋白样品的浓度计算出30 μg样品的上样体积,用裂解液将样品体积配齐,按照蛋白样品与5×SDS loading buffer体积比为4∶1制备上样缓冲液,95 ℃水浴锅煮10 min。配置10%的聚丙烯酰胺凝胶,80 V,30 min;100 V,90 min电泳。250 MA,120 min转膜。5%脱脂奶粉封闭60 min,加入一抗4 ℃孵育过夜。TBST洗10 min×3次,加入适当比例稀释的二抗,室温孵育60 min,TBST洗10 min×3,暗室内曝光,洗片。

1.3 统计分析

所有计量数据均采用均数±标准差表示，采用SPSS16.0统计软件进行分析，样本均数的比较采用Student's t检验进行统计，以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰HMGB1后抑制鼻咽癌细胞株C666-1的增殖

C666-1细胞转染si-HMGB1和阴性对照后，Western blot验证其干扰效率，结果显示与对照组相比，HMGB1的表达水平下调(图1A)。瞬时干扰C666-1细胞HMGB1基因，行CCK-8和细胞周期实验检测干扰HMGB1后细胞增殖和周期的变化，结果显示干扰HMGB1后，细胞增殖能力减弱(P<0.001)，处于G1期细胞比例增多(P<0.001)，S期细胞比例下降(P<0.001，图1B，C)。表明HMGB1能够促进鼻咽癌细胞株C666-1的增殖。

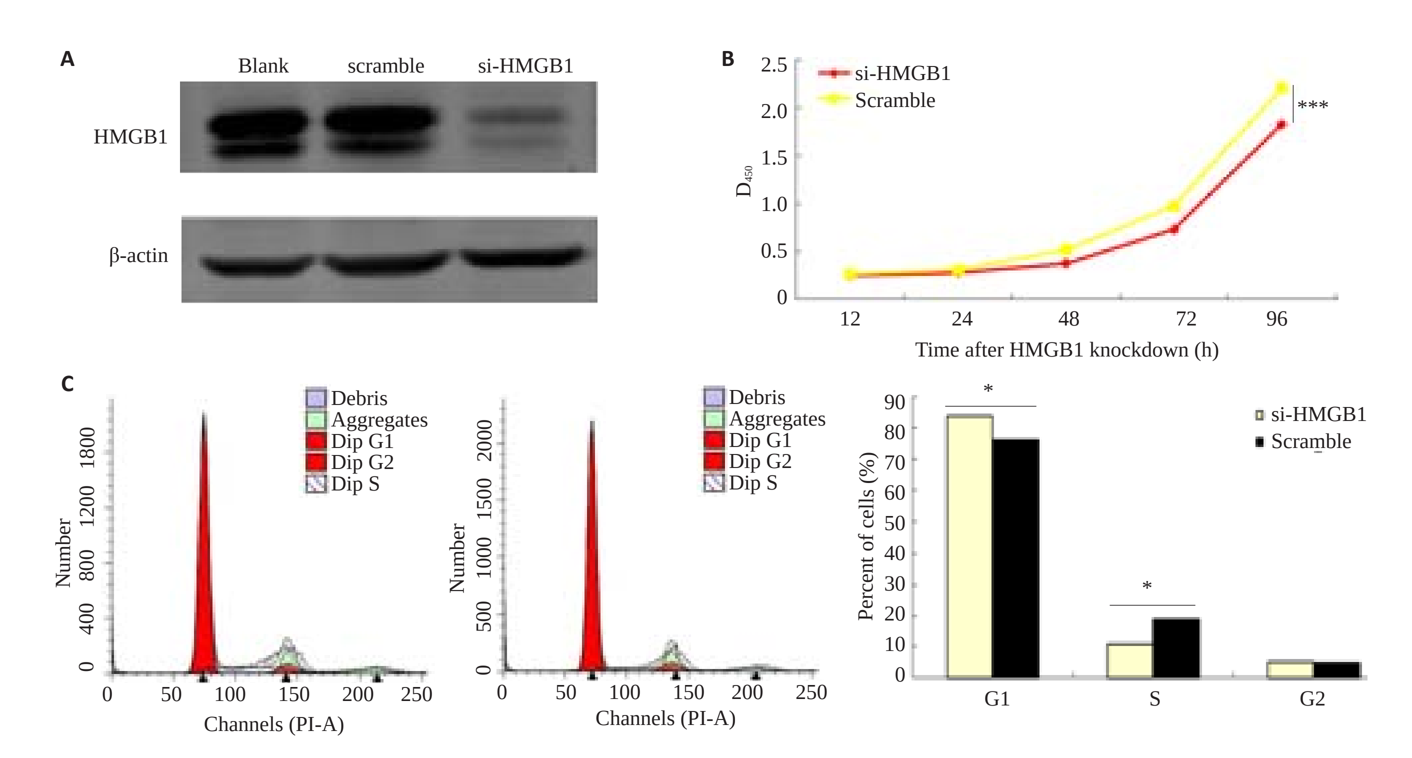


图1 干扰HMGB1后抑制鼻咽癌细胞株C666-1的增殖

Fig.1 Proliferation of C666-1 cells was inhibited after HMGB1 knockdown. *A*: Western blot analysis of the interference efficiency; *B*: CCK-8 analysis; *C*: Cell cycle analysis. ***P<0.001 *vs* nc.

2.2 过表达HMGB1后促进鼻咽癌细胞株C666-1的增殖

C666-1细胞转染带GFP的HMGB1质粒和空GFP质粒后，荧光显微镜观察其转染效率，结果显示质粒转染效率约60%~70%，并主要在核内表达(图2A)。瞬时过表达HMGB1，行CCK-8和EDU实验检测过表达HMGB1后细胞增殖的变化，结果显示过表达HMGB1后，细胞增殖能力增强(P<0.001)，处于S期细胞比例增多(P<0.05，图2B，C)。表明HMGB1能够促进鼻咽癌细胞株C666-1的增殖。

2.3 HMGB1能够促进STAT3，P-STAT3，cyclin D1和CDK6的表达

在C666-1细胞中转染si-HMGB1和阴性对照，验证其干扰效率后，取瞬时干扰HMGB1的C666-1细胞行Western blot检测周期相关蛋白及相关通路蛋白表达的变化，结果显示下调HMGB1后STAT3，P-STAT3，cyclin D1和CDK6的表达也下调(图3)，表明HMGB1可能通过STAT3通路促进cyclin D1和CDK6的表达。

3 讨论

HMGB1作为一种非组蛋白染色质结合蛋白，能够调节基因的转录，参与炎症，增殖等，在多种肿瘤中，如骨肉瘤，结肠癌，肝癌，胃癌，胶质瘤，喉癌中高表达，提示HMGB1参与肿瘤的发生发展[9-13]。此外，高表达HMGB1的肿瘤细胞或者坏死的肿瘤细胞释放HMGB1到细胞外，激活的免疫细胞也可以主动分泌HMGB1[14]，通过与RAGE结合，促进周围的肿瘤细胞增殖，从而使肿瘤不断长大[15]。在结肠癌，肝癌，胸腺癌及食道癌中观察到HMGB1和RAGE的高表达[16-17]。提示细胞内

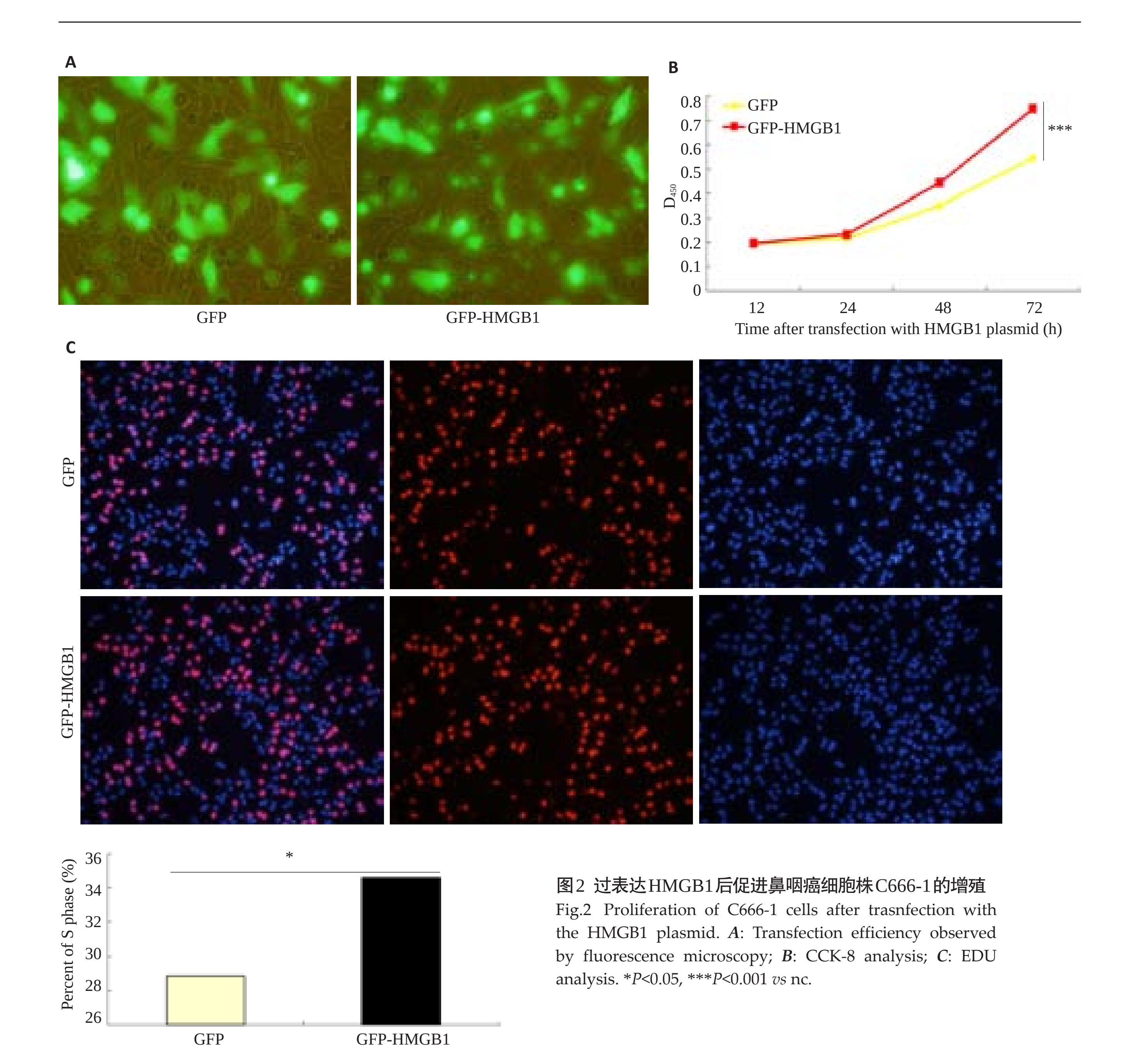


图2 过表达HMGB1后促进鼻咽癌细胞株C666-1的增殖

Fig.2 Proliferation of C666-1 cells after trasnfection with the HMGB1 plasmid. *A*: Transfection efficiency observed by fluorescence microscopy; *B*: CCK-8 analysis; *C*: EDU analysis. **P*<0.05, ****P*<0.001 *vs* nc.

HMGB1和分泌到细胞外的HMGB1及其相关信号通路在肿瘤的发展中起着重要作用。分泌型HMGB1还可以刺激其他细胞产生相应的复杂的生物学效应，调节细胞分化，生长，成熟，调节炎症，神经生长，血管生成等。HMGB1调节肿瘤的相关信号通路有JAK/STAT通路[18]，肿瘤中STAT3的过度活化，可以抑制肿瘤细胞凋亡及促进细胞周期进程[19-20]。HMGB1与RAGE结合后，可以激活ERK1/2，NF-kB，JNK，Rac等通路，通过ERK1/2-Cyclin D1，NF-kB/Cyclin D1等促进肿瘤增殖[21-22]。此外，HMGB1也可以和Toll样受体TLR2和TLR4结合，诱导相应细胞的活化，最终活化NF-kB，从而促进肿瘤增殖和转移[23-25]。在很多文献中有报道，干扰肿瘤细胞HMGB1可以通过下调Cyclin D1介导肿瘤细胞G1/S期阻滞，从而抑制细胞增殖[26-31]。

鼻咽癌是一种多基因遗传性疾病，其发病与遗传因素，EB病毒感染，环境因素，饮食文化等多种因素相关，好发于我国广东，广西，湖南，福建等地区。鼻咽癌由于部位隐蔽，不易于早期诊断，且易于复发和转移，尽管有关其发病机制的研究很多，对其分子机制也进行了深入探索，但是目前临床上整体治疗效果仍不理想。寻找早期诊断的分子标志，治疗靶标及预后监测因子，对鼻咽癌的治疗起着至关重要的作用。

我们在鼻咽癌细胞株C666-1中干扰HMGB1基因后，通过细胞周期和CCK-8实验发现，相对于对照组，细胞S期比例下降，增殖能力减弱，说明HMGB1能促进鼻咽癌细胞株C666-1的增殖。western blot检测发现下调HMGB1，能减弱cyclin D1和CDK6的表达，说明HMGB1可能通过促进cyclin D1和CDK6表达促进

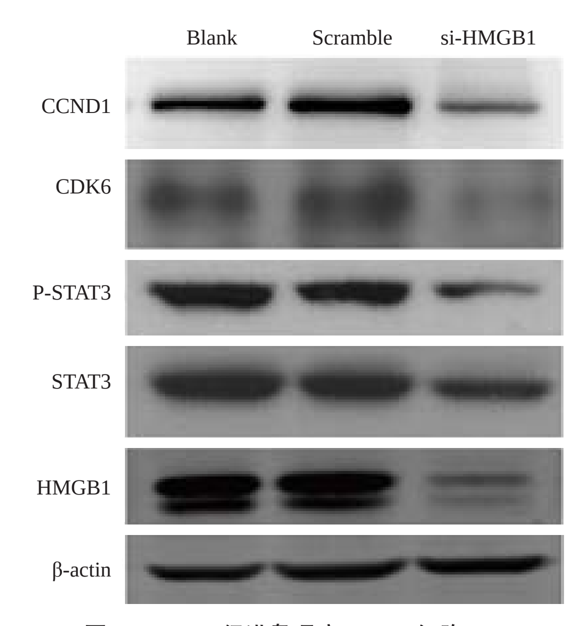


图3 HMGB1促进鼻咽癌C666-1细胞STAT3, P-STAT3, cyclin D1和CDK6的表达

Fig.3 HMGB1 promotes the expressions of STAT3, P-STAT3, cyclin D1 and CDK6 in C666-1 cells analyzed by Western blotting.

细胞由G1期进入S期,从而促进鼻咽癌细胞C666-1的增殖。这也提示HMGB1可能是鼻咽癌发生发展中一个重要的促癌因素,并有可能为鼻咽癌诊断和治疗提供新的方向。

参考文献:

[1] 曹清心, 刘 宇, 凌昌全. HMGB1与肿瘤相关性的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(3): 282-5.

[2] Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis[J]. J Clin Invest, 2015, 125(2): 539-50.

[3] Zhao CB, Bao JM, Lu YJ, et al. Co-expression of RAGE and HMGB1 is associated with cancer progression and poor patient outcome of prostate cancer[J]. Am J Cancer Res, 2014, 4(4): 369-77.

[4] Yang GL, Zhang LH, Bo JJ, et al. Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer[J]. J Surg Oncol, 2012, 106(1): 57-61.

[5] Kostova N, Zlateva S, Ugrinova I, et al. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 337(1/2): 251-8.

[6] Haberer-Guillerm S, Touboul E, Huguet F. Intensity modulated radiation therapy in nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis, 2015, 132 (3): 147-51.

[7] Ho FC, Tham IW, Earnest A, et al. Patterns of regional lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis of clinical evidence[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 98.

[8] Wu D, Ding Y, Wang S, et al. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma[J]. J Pathol, 2008, 216(2): 167-75.

[9] Zhang J, Liu C, Hou R. Knockdown of HMGB1 improves apoptosis and suppresses proliferation and invasion of glioma cells[J]. Chi J Cancer Res, 2014, 26(6): 658-68.

[10] Zhang CC, Gdynia G, Ehemann V, et al. The HMGB1 protein sensitizes colon carcinoma cells to cell death triggered by pro-apoptotic agents[J]. Int J Oncol, 2015, 46(2): 667-76.

[11] Qiu G, Li Y, Liu Z, et al. Clinical value of serum HMGB1 in diagnosis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Med Oncol, 2014, 31(12): 316.

[12] Ueda M, Takahashi Y, Shinden Y, et al. Prognostic significance of high mobility group box 1 (HMGB1) expression in patients with colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2014, 34(10): 5357-62.

[13] Meng Q, Zhao J, Liu H, et al. HMGB1 promotes cellular proliferation and invasion, suppresses cellular apoptosis in osteosarcoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 12265-74.

[14] Palmblad K, Schierbeck H, Sundberg E, et al. High systemic levels of the cytokine-inducing HMGB1 isoform secreted in severe macrophage activation syndrome[J]. Mol Med, 2014, 20: 538-47.

[15] Bassi R, Giussani P, Anelli V, et al. HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration[J]. J Neurooncol, 2008, 87(1): 23-33.

[16] Moser B, Janik S, Schiefer AI, et al. Expression of RAGE and HMGB1 in thymic epithelial tumors, thymic hyperplasia and regular thymic morphology[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94118.

[17] Chen RC, Yi PP, Zhou RR, et al. The role of HMGB1-RAGE axis in migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 390(1/2): 271-80.

[18] Liu H, Yao YM, Yu Y, et al. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages[J]. Shock, 2007, 27(1): 55-60.

[19] Wagner KU, Schmidt JW. The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer[J]. J Carcinog, 2011, 10(32): 50-8.

[20] Slattery ML, Lundgreen A, Kadlubar SA, et al. JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer [J/OL]. Mol Carcinog, 2013, 52(2): 155-66.

[21] Pusterla T, Nemeth J, Stein I, et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a key regulator of oval cell activation and Inflammation-Associated liver carcinogenesis in mice[J]. Hepatology, 2013, 58(1): 363-73.

[22] Feng XJ, Liu SX, Wu C, et al. The PTEN/PI3K/Akt signaling pathway mediates HMGB1-induced cell proliferation by regulating the NF-κB/cyclin D1 pathway in mouse mesangial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 306(12): C1119-28.

[23] Xu X, Zhu H, Wang T, et al. Exogenous high-mobility group box 1 inhibits apoptosis and promotes the proliferation of lewis cells via RAGE/TLR4-dependent signal pathways[J]. Scand J Immunol, 2014, 79(6): 386-94.

[24] Agalave NM, Larsson M, Abdelmoaty S, et al. Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis[J]. Pain, 2014, 155(9): 1802-13.

[25] Conti L, Lanzardo S, Arigoni M, et al. The noninflammatory role of

high mobility group box 1/Toll-like receptor 2 axis in the self-renewal of mammary cancer stem cells[J]. FASEB J, 2013, 27(12): 4731-44.

[26] Ko YB, Kim BR, Nam SL, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein regulates tumor-associated cell migration through the interaction with BTB domain[J]. Cell Signal, 2014, 26 (4): 777-83.

[27] Chen J, Xi B, Zhao Y, et al. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2012, 126(1): 109-17.

[28] Chen J, Liu X, Zhang J, et al. Targeting HMGB1 inhibits ovarian cancer growth and metastasis by lentivirus-mediated RNA interference[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(11): 3629-38.

[29] Feng X, Hao J, Liu Q, et al. HMGB1 mediates IFN-γ-induced cell proliferation in MMC cells through regulation of cyclin D1/CDK4/p16 pathway[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6): 2009-19.

[30] Song B, Song WG, Li ZJ, et al. Effect of HMGB1 silencing on cell proliferation, invasion and apoptosis of MGC-803 gastric cancer cells[J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(1): 11-7.

[31] Ke S, Zhou F, Yang H, et al. Downregulation of high mobility group box 1 modulates telomere homeostasis and increases the radio-sensitivity of human breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2015, 46(3): 1051-8.

（编辑:经 媛）